

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **61-277628**

(43)Date of publication of application : **08.12.1986**

---

(51)Int.Cl.

A61K 37/00  
A61K 35/14  
A61K 37/04  
A61K 45/02

---

(21)Application number : **60-119710**

(71)Applicant : **ASAHI CHEM IND CO LTD**

(22)Date of filing : **04.06.1985**

(72)Inventor : **KAIEDA TOSHIJI**

**YAMADA KIMIMASA**

**YAMAWAKI NAOKUNI**

---

### (54) LYMPHOCYTE-STIMULATION MATERIAL FOR REMEDY OF CANCER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled stimulation material by bonding a specific substance such as interleukin 1 to an insoluble carrier through covalent bond.

CONSTITUTION: The objective lymphocyte-stimulation material for the remedy of cancer can be produced by bonding (A) one or more substances selected from the following four substances (interleukin 1, OK432, interleukin 2 produced by genetic engineering method, and  $\gamma$ -interferon) to (B) an insoluble carrier (inorganic carrier such as activated carbon, glass, etc.; carrier originated from natural polymers such as cellulose, Sepharose, etc.; or synthetic polymer such as polystyrene, polyethylene, etc.) through covalent bond. Lymphocyte means hematocyte other than erythrocyte and platelet and includes the cell fraction obtained by removing granulocyte or B-cell from the lymphocyte.

EFFECT: The stimulation agent is effective to stimulate and activate lymphocyte and induce a strong antitumor immune cell in high safety and operability, and is useful for the remedy, inspection, diagnosis, research, etc., of gastric cancer, pulmonary cancer, mammary cancer, etc.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of



Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index®

Records for: **pn=jp 61277628**

save as alert...

save strategy only...

Output ?	Format: Long	Output as: Browser	display / send
Modify ?	refine search		back to picklist
select all none	Records 1-2 of 2 In long Format		

☐ 1. 1/34/1 (Item 1 from file: 345)

5838158

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 61277628 A2 861208 No. of Patents: 002

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 61277628 A2 861208

LYMPHOCYTE-STIMULATION MATERIAL FOR REMEDY OF CANCER (English)

Patent Assignee: ASAHI CHEMICAL IND

Author (Inventor): KAIEDA TOSHIJI; YAMADA KIMIMASA; YAMAWAKI NAOKUNI

Priority (No,Kind,Date): JP 85119710 A 850604

Applic (No,Kind,Date): JP 85119710 A 850604

IPC: \* A61K-037/00; A61K-035/14; A61K-037/04; A61K-045/02

CA Abstract No: \* 106(15)113544F

Derwent WPI Acc No: \* C 87-018975

JAPIO Reference No: \* 110139C000097

Language of Document: Japanese

Patent (No,Kind,Date): JP 93003855 B4 930118

Patent Assignee: ASAHI CHEMICAL IND

Author (Inventor): KAIEDA GOJI; YAMADA KIMIMASA; YAMAWAKI NAOKUNI

Priority (No,Kind,Date): JP 85119710 A 850604

Applic (No,Kind,Date): JP 85119710 A 850604

IPC: \* A61K-035/14

Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2006 EPO. All rights reserved.

☐ 2. 1/34/2 (Item 1 from file: 351)

0003929333

WPI Acc no: 1987-018975/

**Leucocyte stimulant for cancer therapy - is obt'd. by binding interleukin or gamma-interleukin to a covalent bond**

Patent Assignee: ASAHI CHEM IND CO LTD (ASAHI)

Inventor: KAIEDA T; YAMADA K; YAMAWAKI N

Patent Family ( 2 patents, 1 countries )

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
JP 61277628	A	19861208	JP 1985119710	A	19850604	198703	B
JP 1993003855	B	19930118	JP 1985119710	A	19850604	199306	E

Priority Applications (no., kind, date): JP 1985119710 A 19850604

#### Patent Details

Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes	
JP 61277628	A	JA	4	0		
JP 1993003855	B	JA	3		Based on OPI patent	JP 61277628

#### Alerting Abstract JP A

Leucocyte stimulant is obtd. by binding interleukin 1, OK432, interleukin 2 obtd. by recombinant DNA technology and/or gamma-interferon to an insoluble carrier with covalent bond.

(1) Insoluble carrier includes hydropholic or hydrophobic carrier, such as inorganic base (e.g. activated charcoal, glass, or their derivs, etc); natural polymer (e.g. cellulose, Sepharose, dextran. starch, alginic acid, chitin, or their derivs agar, pectin, gum Arabic, protein, etc); and synthesised polymer (e.g. styrene, vinylacetate, methacrylate, acrylate, acrylonitrile, acrylamide, methyl-vinylketone, vinylpyrrolidone, 2-vinylpyridine, ethylene, propylene, butadiene, etc) (2) Covalent bond, ion bond or physical absorption can be used for solidification of the materials on the surface of the insoluble carriers. (3) In activation of peripheral leucocyte by use of the stimulant, peripheral leucocyte (0.5-3 10 power 6 ml) is cultured in a medium (e.g. RPMI 1640, MEM or albumin-contg. RPMI 1640) and the stimulant is added to the medium and cultured at 25-45 deg.C for 1 to several days to obtain activated leucolyte, which proved to have a strong killing action against tumor cells. USE/ADVANTAGE - Leucocyte stimulant is used for cancer therapy.

#### Class Codes

##### International Patent Classification

IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A61K-035/14			Main		"Version 7"
A61K-037/00; A61K-045/02			Secondary		"Version 7"

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 The Thomson Corporation. All rights reserved.

select <input type="checkbox"/> all <input type="checkbox"/> none		Records 1-2 of 2 In long Format	
Output	Format: Long	Output as: Browser	<input type="button" value="display/send"/>
Modify	<input type="button" value="refine search"/>		<input type="button" value="back to picklist"/>

©1997-2006 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-277628

⑬ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)12月8日

A 61 K 37/00  
35/14  
37/04  
45/027138-4C  
7138-4C  
7138-4C  
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 癌治療用白血球刺激材

⑯ 特 願 昭60-119710

⑰ 出 願 昭60(1985)6月4日

⑱ 発 明 者 海 江 田 豪 児 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内  
 ⑲ 発 明 者 山 田 公 政 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内  
 ⑳ 発 明 者 山 脇 直 邦 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内  
 ㉑ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
 ㉒ 代 理 人 弁理士 清 水 猛

## 明 細 書

## 1 発明の名称

癌治療用白血球刺激材

## 2 特許請求の範囲

インターリューキン1、OK432、遺伝子工学を用いて得られたインターリューキン2およびγ-インターフェロンの4種の物質を単独あるいは2種以上、不溶性担体に共有結合で結合してなることを特徴とする癌治療用白血球刺激材。

## 3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、白血球を活性化して抗腫瘍免疫細胞を誘導する機能を持つ癌治療用白血球刺激材に関する。

(従来の技術)

周知のように、生体の悪性腫瘍に対する免疫監

視機構を担う抗腫瘍免疫細胞としては、キラーT細胞、NK細胞、活性化マクロファージ、K細胞等が重要な役割をはたしていることが報告されている[福沢正洋：医学のあゆみ、126、420('83)]。したがって、悪性腫瘍に対する免疫学的療法としては、癌患者免疫細胞(白血球)を活性化して、これらの抗腫瘍免疫細胞を効率的に誘導活性化することが考えられる。しかしながら、実際の癌患者体内においては、このような悪性腫瘍に対する免疫監視機構の存在にもかかわらず、腫瘍細胞が増殖する。

その主要なメカニズムの1つとして、腫瘍細胞による免疫抑制性細胞(サブプレッサーT細胞、サブプレッサーマクロファージ等)の誘導活性化が報告されている。[藤本重義ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー(S.Fujimoto et al., J. Immunol.) 116, 791('76)]。

かかる免疫抑制性細胞は、腫瘍細胞を障害する機能を担う種々の抗腫瘍免疫細胞の誘導活性化を抑制し、ために腫瘍細胞の増殖を許し、ますます

腫瘍に対する免疫応答能力の低下をまねくと考えられる。また、その他のメカニズムとして、腫瘍細胞による免疫抑制性因子の産生により、腫瘍細胞に対する免疫応答が抑制されている可能性も報告されており〔ジェー・エー・ロスら、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J.A. Roth et al: J. Immunol.) 128, 1955 ('82)〕、かかる免疫抑制状態下にある癌患者体内においては、効率的な抗腫瘍免疫細胞の誘導活性化は困難であると言わなければならない。

したがって、免疫抑制のない抗腫瘍免疫細胞誘導活性化に最適な条件を体外に設定し、癌患者から取り出した白血球を刺激活性化して、強力な抗腫瘍免疫細胞を誘導し、これを元の患者にもどすことによって癌を治療しようとする方法は、効果の高い新しい癌免疫療法となる可能性を有すると考えられる。

#### (発明が解決しようとする問題点)

体外に取り出した白血球を刺激活性化して抗腫

白血球刺激材に係る。

本発明において、不溶性担体に結合する物質は、インターリューキン1、OK432、遺伝子工学を用いて得られたインターリューキン2およびアーインターフェロンであるが、この中でインターリューキン2およびOK432は強力に抗腫瘍免疫細胞を誘導するので好ましく、さらに、インターリューキン2は誘導能力が強力であるので好ましい。本発明で使用するインターリューキン1は、白血球培養から得られたものでもよく、また遺伝子工学を用いて得られたものでもよい。

本発明で用いられる不溶性担体は、親水性担体、疎水性担体いずれも使用できるが、疎水性担体を用いる場合には、特に担体への血清成分の非特異的吸着が生じるため、親水性担体の方が好ましい結果を与える。不溶性担体の形状は、粒子状、繊維状、中空糸状、膜状のいずれの公知の形状も用いることができる。

不溶性担体の材質としては、リガンドを固定化するために、担体が活性化でき、担体の活性化反

応免疫細胞を誘導活性化し、これを癌生体に投与して癌を治療する試みは、現在活発に研究が行なわれているが、白血球の刺激活性化に癌生体より抽出した腫瘍細胞を用いており、非常に操作が煩雑である。

#### (問題点を解決するための手段)

本発明者らは、前記の問題点を解決するために鋭意研究した結果、驚くべきことに、インターリューキン1、OK432、遺伝子工学を用いて得られたインターリューキン2およびアーインターフェロンを不溶性担体に共有結合で固定した刺激材で白血球を刺激活性化することにより、強力な抗腫瘍免疫細胞が誘導されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、インターリューキン1、OK432、遺伝子工学を用いて得られたインターリューキン2およびアーインターフェロンの4種の物質を単独あるいは2種以上不溶性担体に共有結合で結合してなることを特徴とする癌治療用

剤、固定化反応などを含めた全工程を通じて物理的に安定であればよい。具体的には、無機ベースのものにあっては、活性炭、ガラス等およびその誘導体であり、天然高分子由来担体には、セルロース、セファローズ、デキストラン、デンプン、アルギン酸、キチン等の単純多糖類およびその誘導体、寒天、バクチン、コンニャク、アラビアゴム等の複合多糖類およびその誘導体、羊毛、絹蛋白質等の蛋白質およびその誘導体があるが、これらは必要に応じ、架橋反応等の不溶化処理をした後、担体に用いる。

また、合成高分子にあっては、ビニル系高分子には、スチレン、酢酸ビニル、メタクリル酸エステル、アクリル酸エステル、ハロゲン化ビニル、ハロゲン化ビニリデン、アクリロニトリル、アクリルアミド、メチルビニルケトン、ビニルピロリドン、2-ビニルピリジン、エチレン、プロピレン、ブタジエン、イソプレン等およびその誘導体の重合体および共重合体が例示できる。

インターリューキン1、OK432、遺伝子エ

学を用いて得られたインターリューキン2およびγ-インターフェロンをリガンドとして不溶性担体の表面に固定する方法としては、共有結合、イオン結合、物理吸着等のあらゆる公知の方法を用いることができるが、溶出性から考えると、共有結合で固定して用いることが望ましい。そのためには通常固定化酵素、アフィニティークロマトグラフィで用いられる公知の方法を用いることができる。たとえば、不溶性担体をエポキシ活性化し、これにリガンドを結合させる方法等を用いることができる。また、必要に応じて、不溶性担体とリガンドの間に任意の長さの分子（スパーサー）を導入して使用することもできる。

本発明の刺激材の製造方法は、上記方法に限定されるものではなく、たとえばビニルモノマーにオリゴ糖を結合させ、これを重合させる方法、また、たとえばリガンドを活性化して担体に結合させる方法等の方法を用いることができ、本発明は、刺激材の製造方法に規定されるものではない。

本発明における白血球とは、血液細胞のうち赤

血球および血小板を除いた、いわゆる白血球を指すが、この白血球より顆粒球あるいはB細胞を除いた細胞分画も、本発明における白血球の概念に含まれる。本発明において活性化を行う白血球は、公知の遠心分離法にて末梢血より採取した白血球分画を用いてもよく、また、公知のフィコール密度遠心分離法にて分離した単核細胞分画でもよく、あるいは末梢血単核細胞より公知のノイラミダーゼ処理羊赤血球とのロゼット形成で分離濃縮したT細胞分画を使用しても、強力な腫瘍障害性細胞の誘導が可能である。

本発明において誘導活性化する腫瘍障害性細胞は、白血球の中で顆粒球、単球、マクロファージを除くリンパ球分画に属し、とりわけT細胞の性質を有している。

刺激材による末梢血白血球の活性化は、血清成分含有培地もしくはこれにインターリューキン2を添加した培地で行うと強力な腫瘍障害性細胞の誘導が可能である。すなわち、牛胎児血清、牛血清、馬血清等の動物血清あるいはヒト血清を2～

20%含有した培地を調製する。好ましくはヒト血清を2～20%含有した培地を調製する。この場合の培地は、動物細胞培養に一般的に用いられる培地、たとえば、RPMI 1640培地、MEM培地等が使用できる。また、血清成分たとえば、血清アルブミンを添加したRPMI 1640培地でも使用が可能である。

調製した培地中に、種々の方法で採取した末梢血白血球を  $0.5 \sim 3 \times 10^6$  個/皿の細胞濃度で浮遊させ、これに適当量の刺激材を添加し、温度25～45℃で培養を行う。温度25℃以下ではほとんど有効な白血球の活性化が起こらず、温度45℃以上では白血球の生存率が低下する。培養は市販の細胞培養用のプラスチック製容器を使用し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中に行えば簡便である。1日ないし数日培養を行った後、活性化白血球を回収する。もしくはインターリューキン2含有培地で長期培養を行ってもよい。

このようにして得た活性化白血球は、腫瘍細胞を強力に殺すことが判明した。

#### (発明の効果)

本発明の刺激材は、以上述べてきたように、白血球を刺激活性化して、安全かつ操作性よく、強力な抗腫瘍免疫細胞を誘導するものであり、胃癌、肺癌、乳癌等の癌治療および検査診断、研究等に用いようとするものである。

#### 実施例

遺伝子工学を用いて得られたインターリューキン2およびγ-インターフェロン（レコンビナントIL-2、γ-IFN）のそれぞれ100μgあるいはOK432（中外製薬ビシバニール）1mgをリガンドとして公知の方法によつて市販のCrBr活性化セファロース（ファルマシア社製）1ccに結合させ、刺激材を作成した。なお、これらのリガンドの保持量を求めるために、結合反応後の上清および洗浄液中のリガンド量を求め、添加量から減じて計算したところ、95%のリガンドが保持された。

ヒト白血球は次のようにして得た。すなわち、

採血したヒト末梢血をハンクス液で2倍希釈し、フィコールバーク液（ファルマシア社製）に重層し、2000rpmで20分間遠心分離した後、中間層の白血球層を分離して、これをハンクス液で洗った後、自己血清を10%添加したRPMI 1640培地（ニッスイ）に $2 \times 10^6$  / mlの細胞濃度で浮遊させる。この細胞浮遊液を1 mlずつ、細胞培養用の2 mlウエル（ファルコン社3047）に分注し、これに刺激材を50  $\mu$ lずつ添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で温度37℃で培養を行う。3日間培養を行った後、ピペッティングを行って静置すると、担体は容器の底に沈殿するので、上清血清をとり、これをハンクス液で洗った後、自己血清10%添加RPMI 1640培地に $5 \times 10^6$  / mlの細胞濃度で浮遊させる。

この活性化白血球が腫瘍細胞障害性を有するかどうかは、次のようなキラー活性測定法を用いて評価した。培養プレートに付着して増殖する種々のヒト癌細胞株を標的細胞として、 $5 \times 10^4$  / mlの細胞濃度で10%牛胎児血清添加RPMI 16

40培地に浮遊させ、これを10  $\mu$ lずつ10  $\mu$ l容テラサキプレートに分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で温度37℃で培養する。24時間培養を行うと、癌細胞は培養プレート底面に強く付着する。これを培養液で洗った後、活性化白血球浮遊液10  $\mu$ lを添加し、37℃で4時間、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養し、プレートに付着している癌細胞を障害させる。障害を受けた癌細胞は、プレート底面への付着性を喪失し、ハンクス液で洗うと活性が白血球とともに除去される。生残してプレート底面に付着している癌細胞をアセトンで固定し、ギムザ液で染色した後、顕微鏡で計数する。キラー活性は次式により計算する。

$$\text{キラー活性} = \left( 1 - \left[ \frac{\text{（活性化白血球を添加した場合の生存腫瘍細胞数）}}{\text{（活性化白血球を添加しない場合の生残腫瘍細胞数）}} \right] \right) \times 100 (\%)$$

このような方法を用いて、各刺激材で活性化した免疫細胞の腫瘍細胞障害活性を測定したところ、次の表に示すごとく、MKN-1ヒト胃癌細胞に

対して強力な障害活性を示した。

各種刺激材の抗腫瘍免疫細胞誘導活性

刺激材	MKN-1 胃癌細胞に 対する障害活性
IL-2- セファロース	52%
$\gamma$ -IFN- セファロース	25%
OK432-セファロース	50%

#### 比較例

刺激材無添加あるいは不溶性担体（セファロース）のみを添加して、実施例と同様にして実験を行ったところ、抗腫瘍免疫細胞はほとんど誘導されなかった。

代理人 清水

